

## 特 許 協 力 条 約

PCT

REC'D 20 JAN 2005

WIPO

PCT

特許性に関する国際予備報告 (特許協力条約第二章)

(法第12条、法施行規則第56条)

[PCT36条及びPCT規則70]

出願人又は代理人 の書類記号 PH-007	今後の手続きについては、様式PCT/IPEA/416を参照すること。	
国際出願番号 PCT/JP03/10871	国際出願日 (日.月.年) 27.08.2003	優先日 (日.月.年) 27.08.2002
国際特許分類 (IPC) Int. Cl <sup>1</sup> A61K45/00, 31/496, 9/14, 47/32, 47/34, A61P1/04, 29/00, 31/04, 31/06, 31/18, 33/02, 35/00, 37/00, 37/04, 43/00, C07D498/08		
出願人 (氏名又は名称) 寺田 弘		

1. この報告書は、PCT35条に基づきこの国際予備審査機関で作成された国際予備審査報告である。  
法施行規則第57条 (PCT36条) の規定に従い送付する。

2. この国際予備審査報告は、この表紙を含めて全部で 9 ページからなる。

3. この報告には次の附属物件も添付されている。

a ☒ 附属書類は全部で 15 ページである。

☒ 補正されて、この報告の基礎とされた及び/又はこの国際予備審査機関が認めた訂正を含む明細書、請求の範囲及び/又は図面の用紙 (PCT規則70.16及び実施細則第607号参照)

☐ 第I欄4.及び補充欄に示したように、出願時における国際出願の開示の範囲を超えた補正を含むものとこの国際予備審査機関が認定した差替え用紙

b ☐ 電子媒体は全部で (電子媒体の種類、数を示す)。  
配列表に関する補充欄に示すように、コンピュータ読み取り可能な形式による配列表又は配列表に関連するテーブルを含む。 (実施細則第802号参照)

4. この国際予備審査報告は、次の内容を含む。

☒ 第I欄 国際予備審査報告の基礎

☐ 第II欄 優先権

☐ 第III欄 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不作成

☒ 第IV欄 発明の単一性の欠如

☒ 第V欄 PCT35条(2)に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明

☐ 第VI欄 ある種の引用文献

☐ 第VII欄 国際出願の不備

☒ 第VIII欄 国際出願に対する意見

国際予備審査の請求書を受理した日 09.06.2004	国際予備審査報告を作成した日 05.01.2005	
名称及びあて先 日本国特許庁 (IPEA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 安川 聡	4C 3039
電話番号 03-3581-1101 内線 3452		

様式PCT/IPEA/409 (表紙) (2004年1月)

第I欄 報告の基礎

1. この国際予備審査報告は、下記に示す場合を除くほか、国際出願の言語を基礎とした。

☐ この報告は、                     語による翻訳文を基礎とした。  
それは、次の目的で提出された翻訳文の言語である。

- ☐ PCT規則12.3及び23.1(b)にいう国際調査  
☐ PCT規則12.4にいう国際公開  
☐ PCT規則55.2又は55.3にいう国際予備審査

2. この報告は下記の出願書類を基礎とした。(法第6条(PCT14条)の規定に基づく命令に回答するために提出された差替え用紙は、この報告において「出願時」とし、この報告に添付していない。)

☐ 出願時の国際出願書類

☒ 明細書

第 1-7, 10-13, 16, 19-31, 33, 35, 37, 38, 40 ページ、出願時に提出されたもの

第 8, 15, 17, 18, 18/1, 32, 34, 36, 39 ページ\*、09.06.2004 付けで国際予備審査機関が受理したもの

第 9, 9/1, 14 ページ\*、01.12.2004 付けで国際予備審査機関が受理したもの

☒ 請求の範囲

第 4-13 項、出願時に提出されたもの

第                      項\*、PCT19条の規定に基づき補正されたもの

第 1-3, 14 項\*、09.06.2004 付けで国際予備審査機関が受理したもの

第 15-18 項\*、01.12.2004 付けで国際予備審査機関が受理したもの

☒ 図面

第 1/6-6/6 ページ/図、出願時に提出されたもの

第                      ページ/図\*、                     付けで国際予備審査機関が受理したもの

第                      ページ/図\*、                     付けで国際予備審査機関が受理したもの

☐ 配列表又は関連するテーブル

配列表に関する補充欄を参照すること。

3. ☐ 補正により、下記の書類が削除された。

- ☐ 明細書 第                      ページ  
☐ 請求の範囲 第                      項  
☐ 図面 第                      ページ/図  
☐ 配列表 (具体的に記載すること)                       
☐ 配列表に関連するテーブル (具体的に記載すること)

4. ☐ この報告は、補充欄に示したように、この報告に添付されかつ以下に示した補正が出願時における開示の範囲を超えてされたものと認められるので、その補正がされなかったものとして作成した。(PCT規則70.2(c))

- ☐ 明細書 第                      ページ  
☐ 請求の範囲 第                      項  
☐ 図面 第                      ページ/図  
☐ 配列表 (具体的に記載すること)                       
☐ 配列表に関連するテーブル (具体的に記載すること)

\* 4. に該当する場合、その用紙に“superseded”と記入されることがある。

## 第IV欄 発明の単一性の欠如

1. 請求の範囲の減縮又は追加手数料の納付の求めに対して、出願人は、

- ☐ 請求の範囲を減縮した。
- ☐ 追加手数料を納付した。
- ☒ 追加手数料の納付と共に異議を申立てた。
- ☐ 請求の範囲の減縮も、追加手数料の納付もしなかった。

2. ☐ 国際予備審査機関は、次の理由により発明の単一性の要件を満たしていないと判断したが、PCT規則68.1の規定に従い、請求の範囲の減縮及び追加手数料の納付を出願人に求めないこととした。

3. 国際予備審査機関は、PCT規則13.1、13.2及び13.3に規定する発明の単一性を次のように判断する。

- ☐ 満足する。
- ☒ 以下の理由により満足しない。

補充欄に記載

4. したがって、国際出願の次の部分について、この報告を作成した。

- ☒ すべての部分
- ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ に関する部分

第V欄 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第12条（PCT35条(2)）に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

## 1. 見解

新規性 (N)	請求の範囲	15-18	有 無
	請求の範囲	1-14	
進歩性 (IS)	請求の範囲	15-18	有 無
	請求の範囲	1-14	
産業上の利用可能性 (IA)	請求の範囲	1-18	有 無
	請求の範囲		

## 2. 文献及び説明 (PCT規則70.7)

- 文献1 : O'HARA, P. et al, Respirable PLGA microspheres containing rifampicin for the treatment of tuberculosis: manufacture and characterization, Pharm. Res., 2000, Vol.17, No.8, p.955-61
- 文献2 : SHARMA, R. et al, Inhalable microparticles containing drug combinations to target alveolar macrophages for treatment of pulmonary tuberculosis, Pharm. Res., 2001, Vol.18, No.10, p.1405-10
- 文献3 : BARROW, E.L. et al, Use of microsphere technology for targeted delivery of rifampin to Mycobacterium tuberculosis-infected macrophages, Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 1998, Vol.42, No.10, p.2682-9
- 文献4 : PUSHKARSKY, T. et al, Lipopolysaccharide stimulates HIV-1 entry and degradation in human macrophages, J. Endotoxin. Res., 2001 Vol.7, No.4, p.271-6.
- 文献5 : MATSUMOTO, N. et al, ONO-4007, an antitumor lipid A analog, induces tumor necrosis factor-alpha production by human monocytes only under primed state: different effects of ONO-4007 and lipopolysaccharide on cytokine production, J. Pharmacol. Exp. Ther., 1998, Vol.284, No.1, p.189-95

国際調査報告で引用された上記文献1には、直径が1-5  $\mu$ mであって、内部にリファンピシンを有するPLGA粒子が記載されており、該粒子をマクロファージに貪食させることを意図した結核療法が記載されている (Abstract等参照)。そして、54,000の分子量を有するPLGAを使用することも記載されている (Table III参照)。

同文献2には、内部にリファンピシンを有するポリ (D-L乳酸) 微粒子を用いて、マクロファージ内に存在する結核菌を攻撃する、結核の治療法が記載されている (Abstract等参照)。

同文献3には、PLGA粒子内にリファンピシンを含有させ、マクロファージ内に送達する結核の治療法が記載されている (Abstract等参照)。

見解書において引用された上記文献4には、リポ多糖がマクロファージを活性化し、マクロファージのHIV-1による感染を抑制することが記載されている (Abstract等参照)。

同文献5には、ONO-4007やリポ多糖が、マクロファージのTNF- $\alpha$ の放出を活性化し、抗腫瘍作用を有することが記載されている (Abstract等参照)。

## 第Ⅳ欄 国際出願に対する意見

請求の範囲、明細書及び図面の明瞭性又は請求の範囲の明細書による十分な裏付についての意見を次に示す。

<明確性、裏付けについて>

○請求の範囲 1-7, 14

本願請求の範囲 1-3 は、「マクロファージの貪食活性を亢進」及び、「マクロファージ内に存在する病原体の全てもしくは一部を殺して消滅させる」、「病原体を保持するマクロファージを細胞死に誘導する」、あるいは「機能異常の状態にあるマクロファージに作用する」という所望の性質を有する治療薬に関するものである。

本願上記請求の範囲には、上記のような性質を有するあらゆる治療薬が包含されるが、PCT 6 条の意味において明細書に裏付けられ、PCT 5 条の意味において開示されているのは、クレームされた治療薬のごくわずかな部分にすぎないものと認められる。

また、上記請求の範囲においては、治療薬の性質が特定されているのみであり、その有効成分は何ら特定されていない。出願時の技術常識を勘案しても、どのような有効成分を用いれば、上記のような性質を有する治療薬を調製し得るかが自明であるとも認められないことから、上記治療薬にどのようなものが包含されるかを特定できず、本願上記請求の範囲は、PCT 6 条における明確性の要件を欠いている。

## 補充欄。

いずれかの欄の大きさが足りない場合

## 第 IV 欄の続き

発明 1：請求の範囲 1, 2, 4, 15-17 及び、請求の範囲 3, 5-14 の一部  
発明 2：請求の範囲 18 及び、請求の範囲 3, 5-14 の一部

上記発明 1, 2 は、マクロファージの食食活性を亢進し、マクロファージに作用する治療薬である点で共通している。

しかしながら、下記文献に記載の通り、マクロファージの食食活性を亢進し、マクロファージに作用する治療剤は本願出願時に公知であるので、上記発明 1, 2 の間に、同一又は対応する特別な技術的特徴を含む技術的な関係がなく、単一の一般的発明概念を形成するように連関している一群の発明とは認められない。

そして発明 1 は、病原体を原因とする疾患を対象とするマクロファージに作用する治療薬に係る発明であり、発明 2 は、そのような病原体を原因としない疾患を対象とするマクロファージに作用する治療薬に係る発明である。

したがって、本件国際出願の請求の範囲には、2 個の連関していない発明が含まれるものと認められる。

## 文献

・ SHARMA, R. et al, Inhalable microparticles containing drug combinations to target alveolar macrophages for treatment of pulmonary tuberculosis, Pharm. Res., 2001, Vol. 18, No. 10, p. 1405-10

上記文献には、ポリ (D-L 乳酸) により形成されている微粒子に薬剤を包含させてマクロファージを処理することにより、当該薬剤を溶解状態で処理した場合よりもマクロファージ細胞内の薬剤濃度を高めることができる旨が記載されている (第 1407 頁左欄下から 15 行～下から 11 行、第 1408 頁第 2 図等参照)。

上記文献には、マクロファージの食食活性が積極的に亢進されることについては特に明記されていないが、上記文献の微粒子の構成成分であるポリ (D-L 乳酸) は、マクロファージが食食し得る薬物担体微粒子としての要件を満たすものとして本願明細書中 (第 13 頁第 5 行) で挙げられているものであり、また、微粒子中に内包される治療薬がリファンピシンである点でも、上記文献の微粒子は、本願明細書に記載されている微粒子と共通していることから、上記文献記載のリファンピシン-ポリ (D-L 乳酸) 微粒子は、その程度において多少の差異はあるとしても、本願明細書中に記載されている微粒子と同質の、「マクロファージの食食活性を亢進」する作用を有するものであると推認される。

そして、出願人は陳述書において、上記推認が不合理なものというに足る証拠を示しておらず、また、上記文献でマクロファージに投与された微粒子に包含された薬剤が「マクロファージに作用する治療薬」であることは明らかであることから、結局、上記文献には「マクロファージの食食活性を亢進し、マクロファージに作用する治療薬」が記載されているものと認めることができる。

## 補充欄

いずれかの欄の大きさが足りない場合

## 第 V 欄の続き

## ○請求の範囲 1, 2, 4, 6-14

(1) 請求の範囲 1, 2, 4, 6-14 に記載された発明は、上記文献 1 に記載されており、新規性、及び進歩性を有さない。

(2) 請求の範囲 1, 2, 4, 6, 7, 12-14 に記載された発明は、上記文献 2 に記載されており、新規性、及び進歩性を有さない。

(3) 請求の範囲 1, 2, 4, 6-9, 12-14 に記載された発明は、上記文献 3 に記載されており、新規性、及び進歩性を有さない。

上記文献 1-3 には、マクロファージの食食活性が亢進される点に関する明記はないが、上記文献の微粒子の構成成分であるポリ (D-L 乳酸) は、マクロファージが食食し得る薬物担体微粒子としての要件を満たすものとして本願明細書中 (第 13 頁第 5 行) で挙げられているものであり、また、微粒子中に内包される治療薬がリファンピシンである点でも、上記文献の微粒子は、本願明細書に記載されている微粒子と共通していることから、上記文献記載のリファンピシン-ポリ (D-L 乳酸) 微粒子は、その程度において多少の差異はあるとしても、本願明細書中に記載されている微粒子と同質の、「マクロファージの食食活性を亢進」する作用を有するものであると推認され、この点を相違点とすることはできない。

なお、出願人は 01.12.2004 付け答弁書において、上記文献に記載されている微粒子は、本願実施例の微粒子と、その製法や、用いるポリマーの分子量等が異なる点を指摘しているが、本願上記請求の範囲においては、微粒子の製法は何ら特定されておらず、また、ポリマーの分子量に関しても、特定されていないか、されているとしても、上記文献と同等の範囲であることから、この点を相違点とすることはできない。そして、本願明細書の記載を参酌しても、特定の製法の場合のみに、マクロファージの食食活性が亢進され得ることが示されているとも認められないし、また、請求の範囲 10 において、1,500 から 150,000 の PLGA を使用し得ることが記載されているように、用いるポリマーの分子量も、幅広い範囲から選択可能であると認められることから、出願人の上記指摘によっても、上記文献 1-3 に記載の微粒子が、マクロファージの食食活性を亢進するものであるとの推認が不合理なものというに足る証拠が示されているとは認められない。

## 補充欄

いずれかの欄の大きさが足りない場合

## 第 V 欄の続き

## ○請求の範囲 2, 4-7, 14

本願請求の範囲 2 に係る治療薬は、(a) マクロファージの貪食活性を亢進する、及び、(b) 病原体を保持するマクロファージを細胞死に誘導する、という特性を有することが特定されており、本願明細書においては、その具体例として、リポ多糖をマクロファージに作用させて、エイズの治療に用いることが記載されている（明細書第36-38頁参照）。一方、上記文献 4 には、リポ多糖をマクロファージに作用させてエイズへの感染抑制に用いることが記載されている。

本願明細書に記載の上記具体例と、引用文献 4 に記載の発明は、有効成分が共にリポ多糖であり、また、適用対象となる疾患、及び、薬剤をマクロファージに作用させる点でも共通していることから、上記文献 4 中での明記はないものの、上記文献 4 に記載の発明は、上記 (a)、(b) の特性を有しているものと推認される。

よって、請求の範囲 2、及び、該請求項を引用する請求の範囲 4-7, 14 に記載された発明は、上記文献 4 に対して新規性、及び進歩性を有さない。

なお、出願人は 01.12.2004 付け答弁書において、文献 4 のリポ多糖が大腸菌のものであり、本願実施例の多糖と異なるものである旨指摘しているが、本願上記請求の範囲においては、有効成分が何ら特定されておらず、この点を相違点とすることはできない。そして、本願明細書の記載を参酌しても、特定の菌由来のリポ多糖のみが、上記 (a)、(b) の特性を有していることが示されているとも認められなことから、出願人の上記指摘によっても、上記文献 4 に記載の発明が、上記 (a)、(b) の特性を有しているとの推認が不合理なものというに足る証拠が示されているとは認められない。



## 補充欄

いずれかの欄の大きさが足りない場合

## 第 V 欄の続き

## ○請求の範囲 3, 5-7

本願請求の範囲 3に係る治療薬は、(a) マクロファージの食食活性を亢進する、及び、(b) 機能異常の状態にあるマクロファージに作用する、という特性を有することが特定されており、本願明細書においては、その具体例として、リボ多糖をマクロファージに作用させて、がんの治療に用いることが記載されている(明細書第34-35頁参照)。一方、上記文献 5 には、同様に、リボ多糖類をマクロファージに作用させて、がんの治療に用いることが記載されている。

本願明細書に記載の上記具体例と、引用文献 5 に記載の発明は、有効成分が共にリボ多糖であり、また、治療対象疾患、及び、薬剤をマクロファージに作用させる点でも共通していることから、上記文献 5 中での明記はないものの、上記文献 5 に記載の発明は、上記 (a)、(b) の特性を有しているものと推認される。

よって、請求の範囲 3、及び、該請求項を引用する請求の範囲 5-7, 14 に記載された発明は、上記文献 5 に対して新規性、及び進歩性を有さない。

なお、出願人は 01. 12. 2004 付け答弁書において、文献 5 のリボ多糖がサルモネラのものであり、本願実施例の多糖と異なるものである旨指摘しているが、本願上記請求の範囲においては、有効成分が何ら特定されておらず、この点を相違点とすることはできない。そして、本願明細書の記載を参酌しても、特定の菌由来のリボ多糖のみが、上記 (a)、(b) の特性を有していることが示されているとも認められなことから、出願人の上記指摘によっても、上記文献 5 に記載の発明が、上記 (a)、

(b) の特性を有しているとの推認が不合理なものというに足る証拠が示されているとは認められない。

## ○請求の範囲 15-18

本願上記請求の範囲に係る発明は、上記文献 1-5 に対して、新規性、及び進歩性を有する。

ある。

本発明者らは、鋭意研究を進めた結果、病原体媒体としての病原体感染マクロファージを殺滅すること、病原体感染マクロファージ内の病原体を殺滅すること、又は、疾病のために機能が異常となったマクロファージに作用することを目的とした、全く新しい着想を得るに到り本発明を完成したものである。

本発明の治療薬は、マクロファージの貪食活性を亢進し、マクロファージ内の病原体を殺滅することを特徴とする。

また、本発明の治療薬は、マクロファージの貪食活性を亢進し、病原体を保持するマクロファージを細胞死に誘導することを特徴とする。

また、本発明の治療薬は、マクロファージの貪食活性を亢進し、機能異常の状態にあるマクロファージに作用することを特徴とする。

また、本発明の治療薬は、抗酸菌症、エイズ、クラミジア症又はトキソプラズマ症のいずれかに対するものであることが望ましい。これにより、マクロファージが病原体を保持することによる疾患を有効に治療することができる。

また、本発明の治療薬は、クローン病、リウマチ、がん又は免疫不全症候群に対するものであることが望ましい。これにより、マクロファージが機能異常の状態にあることによる疾患を有効に治療することができる。エイズは免疫不全症候群に含まれる。

また、前記マクロファージは、粘膜組織に常在するものであることが望ましい。これにより、呼吸器、消化器あるいは生殖器など、病原体が初感染を起こす部位で疾患を有効に治療することができる。

また、前記マクロファージは、腹腔、大網、乳斑、肺胞、肺間質、肝臓、門脈域、脾臓、骨髓、胸腺、消化管、口腔偏頭、副腎、脳下垂体、甲状腺間質、ランゲルハンス島、副甲状腺、松果体、精巣、卵巣、卵管、子宮、胎盤、皮膚、髄膜、脳質、脈絡叢のいずれかに常在するもの、又は、前記マクロファージは、マイクログリア、マイクログリアの前駆細胞

胞、グリア細胞、グリア細胞の前駆細胞、前記常在マクロファージの前駆細胞、常在マクロファージ類縁細胞、若しくは常在マクロファージ類縁細胞の前駆細胞であることが望ましい。これにより、体内の種々の臓器あるいは組織に起こる疾患を有効に治療することができる。

- 5      また、本発明の治療薬は、PLGA（ポリ（乳酸／グリコール酸）共重合体）を含み、結核に対するものであることを特徴とする。

また、さらに、リファンピシンを含むことが望ましい。これにより、結核菌を殺滅する治療薬を提供できる。

- 10      また、分子量1,500から150,000のPLGAを含むことが望ましい。これにより、マクロファージに貪食されかつ生分解性の微粒子製剤を提供できる。

また、分子量1,500から75,000のPLGAを含むことが望ましい。これにより、マクロファージに貪食されかつマクロファージ内で薬物を放出しやすい微粒子製剤を提供できる。

- 15      また、さらにPVA（ポリビニルアルコール）、PEG（ポリエチレングリコール）、PEO（ポリエチレンオキシド）、糖、タンパク質、ペプチド、リン脂質又はコレステロールの少なくとも1つを含むことが望ましい。これにより、マクロファージの種類に応じて活発に貪食される微粒子製剤を提供できる。

- 20      また、さらに、PVA、PEG、PEO、糖、タンパク質、ペプチド、リン脂質又はコレステロールの少なくとも1つを含み、主たる粒子直径が1～6ミクロンである微粒子製剤であることが望ましい。これにより、マクロファージの貪食機能を有効に利用してマクロファージ内に有効に取り込ませることができる。

- 25      また、貪食されることによりマクロファージの貪食活性を亢進することが望ましい。

また、分子量5,000から20,000のPLGAを含み、結核に対するものであることが特に望ましい。

また、膜乳化法により製造されたものであることが特に望ましい。

また、パントエア・アグロメランス (Pantoea agglomerans) のリポ多糖を含み、エイズに対するものであることが特に望ましい。

また、パントエア・アグロメランス (Pantoea agglomerans) のリポ多糖を含み、肺がん細胞に対して細胞障害作用を有することが特に望ましい。

本明細書は本願の優先権の基礎である特願 2002-247871 の明細書及び／又は図面に記載される内容を包含する。

ら薬物が一定の持続性を保ちながら放出されるという目的に対し最適で  
あると考えられる。

感染症病原体を保持したマクロファージの特異的殺滅を可能とする新規

## 5 治療薬の提供

結核菌を始めとした種々の感染性病原体を保持したマクロファージの特  
異的な貪食活性を積極的に活用して、マクロファージ内の病原体又は病  
原体を保持したマクロファージそのものを殺滅するためには、下記の治  
療薬が有効である。

### 10 (1). マクロファージの貪食活性を亢進する治療薬

(2). マクロファージ内の感染病原体に対し直接の殺滅効果をもつ治療薬

(3). マクロファージに作用する治療薬

(1)の治療薬は、感染病原体保持/非保持のマクロファージに選択的に  
貪食され得る性質を有することが望ましい。従来、マクロファージの貪  
15 食能を活性化する物質が存在することが知られていた（公知事項）。し  
かし、この性質を積極的に利用してマクロファージ内の病原体に作用す  
る治療薬を開発する試みは全く為されていない（新規事項）。(2)、(3)  
のタイプは、病原体に直接作用する種々の薬物が対象になるばかりでな  
く、病原体保持/非保持マクロファージの生理機能を改変する作用を持  
20 つDNA又はRNAなど遺伝子自体も薬物として使用可能である。(1)、(2)、  
(3)を組み合わせた感染性病原体除去に有効な治療薬を開発する試みは  
全く為されておらず、本発明の治療薬は、感染性病原体に対する治療に  
有効な新しいタイプの治療薬である（新規事項）。

例えば、アンチマイクロバイアルエジェント アンド ケモセラピー  
25 (Antimicrobial Agents and Chemotherapy 1998年 第42巻 第10号  
pp.2682-2689) には、PLGAにリファンピシンを含有する粒子の抗結

核作用が開示されている。ところが、この報告では P L G A 粒子による  
貪食活性の亢進に関しては全く述べられていない。さらに、リファンピ  
シン含有 P L G A 粒子は、単独のリファンピシンに比べ抗結核薬として  
の薬効は向上していないことから、本発明の粒子とは異なった性状を有  
5 していることが明らかである。さらに、図 4 及び図 5 に示すようにリフ  
アンピシンの放出の制御には P L G A の分子量が重要である。ところが、  
上記報告には、P L G A の調製の際に用いた P L G A の分子量の記載が  
為されていない。おそらく本発明の粒子とは異なる分子量を持つ P L G  
A を用いたために抗結核薬としての機能を有するに至らなかったものと  
10 推測される。抗結核薬活性を有する P L G A 粒子の調製に際しては、P  
L G A の分子量、モノマー比及び調製された粒子の直径に関し適正なも  
の用い、マクロファージの貪食による粒子の取り込みとマクロファージ  
内での抗結核活性とを評価しないといけない。以上の点を総合するなら  
ば、上記論文に記載されている P L G A 粒子は、P L G A のモノマー比、  
15 粒子の直径が本発明における“適する範囲”にあるなど、素材に関し一  
定の共通性が認められるものの粒子に関する正確な性状が記載されてお  
らず、抗結核薬作用をも有していない。従って、本発明の新規性・進歩  
性を否定する先行例とはなり難いものである。

更に、ファーマシューティカル リサーチ (Pharmaceutical  
20 Research 2000年 第17巻 第8号 pp.955-961) に分子量82,500の P  
L G A を用いて作製したリファンピシン含有粒子の調製方法が開示され  
ているが、この粒子の調製法は本発明とは異なっている。分子量82,500  
の P L G A を用いたリファンピシン含有 P L G A 粒子の結核菌殺滅効果  
は、ファーマシューティカル リサーチ (Pharmaceutical Research  
25 2001年 第18巻 第9号 pp.1315-1319) に開示されている。これを見  
ればリファンピシン含有 P L G A 粒子の抗結核活性は試験管内ではリフ  
アンピシン単独での効果にも及ばないし、動物実験においても明らかな  
治療効果があるとは言えない。リファンピシン含有 P L G A 粒子が抗結

細胞内結核菌を殺滅するかを検討した報告は無い。前述の「生命を支えるマクロファージ」を参照すれば明らかなようにマクロファージは組織特異性が高く血中に存在するマクロファージを用いて得られる結果を直ちに組織特異的マクロファージ、例えば肺胞マクロファージ、に対して

5 も適用可能とすることができないことは周知の事実である。すなわち本発明の新規性は、概念の新規性は言うまでもないが、この概念を支える実施例として、肺胞マクロファージを用いて、しかも該細胞の貪食活性を誘導しかつ、実際に肺胞マクロファージ内で高い薬物濃度を保持し、かつこの製剤が実際に肺胞マクロファージ内結核菌の殺滅がリファピシ

10 ン単独に比べ明らかに優れたリファンピシン含有 P L G A 粒子を製造し提供する点が挙げられる。

一方、粒子をマクロファージに貪食させることによって、マクロファージから非特異的な抗菌物質、例えば過酸化水素、酸素ラジカルの産生が増強することは既に広く知られている。例えばヨーロッパジャー

15 ナル オブ ファーマシューティカル サイエンスズ (European Journal of Pharmaceutical Sciences 2000年 第15巻 pp.197-207) には、P L G A 粒子を貪食させることで、血中単球に性格の類似した培養マクロファージから過酸化水素の産生が増強することが開示されている。然しながら、マクロファージが P L G A を貪食することにより、貪

20 食活性が増強することは記載されていない。更にマクロファージの活性化はきわめて多様性に富んでいることから、貪食により過酸化水素の産生が増強することが、直ちに貪食増強と直接に結びつくものではない。

実際の感染症治療に際しては、(1)のタイプの治療薬に(2)又は(3)のタイプの薬物を含有させた製剤が有効である。つまり、(2)、(3)のタイプの治療薬がマクロファージ内で有効に作用するために、(1)の治療薬

25 は、マクロファージの貪食活性を亢進して (2)、(3)のタイプの治療薬をマクロファージ内に運搬する機能を高める。すなわち、本発明の対象となる治療薬は図 1 に示すように、マクロ

ファージに貪食されやすく、貪食されることによってマクロファージの貪食活性を亢進するため、単に治療薬のみを投与した場合よりもマクロファージ内の治療薬の濃度が著しく高くなる。すなわち、右側の従来の薬液内にあるマクロファージに取り込まれる薬剤と比較して、左側の本

5 発明による薬剤封入微粒子は積極的にマクロファージに取り込まれてマクロファージ内の薬剤濃度が著しく高くなる。このように、請求の範囲に記載した「マクロファージの貪食活性を亢進し、」とは、その治療薬がマクロファージの貪食能を高めることによって、単に治療薬を投与した場合よりもマクロファージ内のその治療薬の濃度が著しく高くなるこ

10 とを意味する。

#### 具体的な適用例：結核

本発明に提示している治療薬の有効性に関する一例として結核について述べる。結核菌は飛沫により気道から肺胞に侵入し、肺胞マクロファージに貪食される。通常であれば貪食された病原体は、細胞内でタンパク分解酵素の攻撃により分解される運命にある。しかし結核菌はタンパク分解酵素の攻撃を回避して、マクロファージ内で生存する。このマクロファージ内の結核菌はマクロファージ外に移行し、持続的に宿主体内に結核菌を供給する。現在抗結核菌薬剤としては、イソニアジド、リファンピシン、硫酸ストレプトマイシン、エタンブタール等の薬物が用い

15 られている。いずれの薬物もマクロファージ外の結核菌に対しては有効であるが、肺胞マクロファージ内の結核菌に対しては効果を示さない。このことは肺胞マクロファージ内に結核菌を殺滅するに十分な薬物濃度が得られないことに主要な原因が求められる。

20 そこで、肺胞マクロファージの貪食作用を利用して肺胞マクロファージ内に結核菌を殺滅するに十分な薬物濃度が得られれば、肺胞マクロファージ内結核菌をも殺滅することが出来る。この場合貪食作用はマクロファージ内の薬物濃度を選択的に上昇せしめるために利用されることに



なる。

A. マクロファージの食食能を増強させる治療薬

る病原体に対して効率的に作用させるという本発明の目的を達成することが可能となる。上記の結果は、本発明の基本概念である“マクロファージの貪食活性を亢進”することにより、マクロファージ内の病原体に作用する治療薬をマクロファージ内に有効に取り込ませる新規治療薬の

5 一例を示すものである。

### 3. RFP-PLGA微粒子製剤の貪食によるマクロファージ内結核菌殺滅効果

#### (a)マクロファージ内結核菌 (BCG) の生存率測定法

10 (1). 乾燥BCGワクチンを生理食塩水で溶解し (12mg/mL) 攪拌した後、KRD培地 (3~4mL) をT-25培養フラスコに移しBCG懸濁液を40 $\mu$ L入れ、乾式インキュベーター37℃で培養した。

(2). 実験には菌液とガラスビーズを1:4の割合でサンプルチューブに入れ、ボルテックスミキサーで1分間攪拌後、さらに、超音波洗浄機での5分間の超音波処理によって菌体の分散を行った。

15 (3). NR8383を1 $\times$ 10<sup>6</sup>個/mLの濃度で6穴プレートに入れた (全体積5mL)。結核菌 (BCG) を細胞当たり10個 (multiplicity of infection (MOI) =10) で細胞培養液に添加した。

(4). 37℃、炭酸ガス培養器で4時間感染させたのち、2,000回転/分、5分間 (SCT15B) 遠心後、上清を除いた。無血清培地を用いて同様に遠心

20 心を2回繰り返し細胞の外にいる菌を除いた。

(5). NR8383を1 $\times$ 10<sup>6</sup>個/mLの濃度で24穴プレートに蒔いた。

(6). NR8383に各RFP-PLGA微粒子を細胞1個あたり10個の割合で培養液に添加した。

(7). 37℃、炭酸ガス培養器で4時間貪食させたのち、細胞外にある粒子

25 を0.25%トリプシンを用いて除外した。

(8). 80%パーコールを加えて40%パーコール-細胞液を作り、更に70%パーコールを加え密度勾配を作った。10,000回転/分、5分間 (SORVALL Biofuge fresco) 遠心後、40%、70%パーコール間の界面の

の貪食を介する薬剤投与によることで、薬剤そのものの抗結核作用にかかわらず20倍以上の治療係数の向上が得られた。

マクロファージの貪食活性を亢進し機能異常の状態にあるマクロファージ

#### 5 マクロファージに作用する治療薬の提供

がん組織には、通常多数のマクロファージが浸潤していることが知られている。これはがん細胞が生体にとって異物であるために、がん細胞を排除する目的でマクロファージが集積することに基づく。マクロファージ機能が正常であれば、がん細胞は傷害され消滅するが、マクロファージの機能に異常があれば、がん細胞を傷害できずがん細胞は成長し、腫瘍塊を形成するに至る。ところで既に述べたように、マクロファージの活性化によってマクロファージはがん細胞に対しても傷害を与えることが可能になる。従って、マクロファージの貪食活性を亢進することで機能異常となったマクロファージにがん細胞傷害作用を獲得させ、がんを有効に治療することができ得る。

一方、表2に示したように肺胞マクロファージの貪食作用はリポ多糖（ $1\mu\text{g}/\text{mL}$ ）の処理により166%も増強し、リポ多糖により肺胞マクロファージが活性化された。そこで、貪食能をリポ多糖により活性化された肺胞マクロファージは肺がん細胞に対して細胞傷害作用を発現すると考えられる。従って、ここでは、リポ多糖による活性化肺胞マクロファージの肺がん細胞傷害作用の例を示すものである。

具体的な適用例：肺がん

肺胞マクロファージを活性化することによる肺がん細胞傷害効果を適用例として示す。

1. リポ多糖による肺胞マクロファージの活性化及び肺胞マクロファージと佐藤肺癌細胞の共培養

(1). NR8383を $1 \times 10^6$ 個/ $\text{mL}$ の濃度で24穴プレートに入れた（全体積

が示された。

マクロファージの貪食活性を亢進し、病原体を保持するマクロファージを細胞死に誘導する治療薬の提供

- 5 本実施の形態の治療薬は、マクロファージの貪食活性を亢進することにより、病原体を保持するマクロファージを細胞死に誘導することを特徴とする。

- 表2で示したように、マクロファージ活性化剤としてよく知られている  
10 リポ多糖はマクロファージの貪食活性を亢進する。また、マクロファージ活性化因子の代表的なサイトカインであるインターフェロン $\gamma$ も貪食活性を亢進する。すなわち、マクロファージの貪食活性の亢進はマクロファージ活性化の指標の一つである。本件で示した貪食による貪食活性の亢進は、貪食という刺激が貪食亢進というマクロファージの活性化を  
15 誘導したといえる。また、リポ多糖やインターフェロン $\gamma$ によるマクロファージの活性化に伴い、マクロファージの膜構造の変化が誘起され、マクロファージ内に膜結合型腫瘍壊死因子(TNF)が誘導されることが知られている。従って、貪食という刺激によるマクロファージの活性化に伴い膜結合型TNFが誘導されることになる。

- 20 エイズはエイズウイルス感染によって、T細胞が破壊され、免疫応答が不全となることで発症する。ところで、エイズウイルス感染はT細胞に感染するだけでなく、マクロファージに感染する。この感染はエイズウイルスがT細胞、マクロファージ細胞膜上に共通して発現するCD4タンパク質に吸着することで始まることによる。エイズウイルスが感染  
25 したマクロファージは、細胞死に陥ることなく持続的にエイズウイルスを産生しII. (2)で詳述したごとく感染病原体媒体となる。

従って、エイズウイルスが感染したマクロファージを細胞死に誘導することができれば、感染病原体媒体の殺滅が達成されることになる。

tuberculosis)、若しくはマイコバクテリウム ボvis (Mycobacterium bovis) を原因菌とする結核、マイコバクテリウム レプラ (Mycobacterium Lepae) を原因菌とするライ、又はマイコバクテリウム アビウム (Mycobacterium avium) 他を原因菌とする非定型抗酸菌症などがあり、クラミジア症の原因菌としてはクラミジア ニューモニア (Chlamydia pneumoniae)、クラミジア トラコマティス (Chlamydia trachomatis)、又はクラミジア シッタシ (Chlamydia psittaci) などがあり、いずれも本発明を有効に適用できる。ところで、本実施の形態で示したRFP-PLGA微粒子のマクロファージ内結核菌殺滅効果は、食食によって食胞内に取り込まれたRFP-PLGA微粒子からリファンピシンが遊離し、食胞膜を透過し、さらに結核菌含有食胞の食胞膜を透過するという、少なくとも2回の細胞内小胞膜構造の通過がなければ、達成されない。上記に示した原因菌のマクロファージ内での生残戦略は様々である。抗酸菌症全般、レジオネラ、トキソプラズマは食胞内に原因菌が生残することで、マクロファージ内で生存する。リステリア、クラミジアは原因菌が、食胞から脱出する特徴を有する。これら原因菌の細胞内生存態様は、食胞内に原因菌が存在する場合と比べ、薬剤の到達の観点からみれば、薬剤が一度食胞膜を透過すれば薬効が期待できるので、より容易であると推定される。また、エイズでは細胞内に存在する原因菌に薬剤が到達すれば薬効が期待できる点で、リステリアなどと同様である。以上のことから本発明は上記記載の原因菌に対しても有望な治療である。

また、本発明を有効に適用できる各疾患に対する薬品を以下に挙げる。

1) 抗酸菌症：リファンピシン、イソニアジド、エタンブトール、ピラジナミド、アジスロマイシン、カナマイシン、硫酸ストレプトマイシン、エンピオマイシン、エチオナミド、サイクロセリン、レボフロキサシン、ジアフェニルスルホン。

## 請 求 の 範 囲

1. (補正) マクロファージの貪食活性を亢進し、マクロファージ内に存在する病原体の全てもしくは一部を殺して消滅させることを特徴とする治療薬。
- 5 2. (補正後) マクロファージの貪食活性を亢進し、病原体を保持するマクロファージを細胞死に誘導することを特徴とする治療薬。
- 10 3. (補正後) マクロファージの貪食活性を亢進し、機能異常の状態にあるマクロファージに作用することを特徴とする治療薬。
4. 抗酸菌症、エイズ、クラミジア症又はトキソプラズマ症に対するものであることを特徴とする請求項 1 又は 2 記載の治療薬。
- 15 5. クローン病、リウマチ、がん又は免疫不全症候群に対するものであることを特徴とする請求項 2 又は 3 記載の治療薬。
6. 前記マクロファージは、粘膜組織に常在するものであることを特徴とする請求項 1 乃至 4 いずれかに記載の治療薬
- 20 7. 前記マクロファージは、腹腔、大網、乳斑、肺胞、肺間質、肝臓、門脈域、脾臓、骨髓、胸腺、消化管、口腔偏頭、副腎、脳下垂体、甲状腺間質、ランゲルハンス島、副甲状腺、松果体、精巣、卵巢、卵管、子宮、胎盤、皮膚、髄膜、脳質、脈絡叢のいずれかに常在するもの、又は、前記マクロファージは、マイクログリア、マイクログリアの前駆細胞、グリア細胞、グリア細胞の前駆細胞、前記常在マクロファージの前駆細胞、常在マクロファージ類縁細胞、若しくは常在マクロファージ類縁細胞
- 25

胞の前駆細胞であることを特徴とする請求項1乃至4いずれかに記載の  
治療薬。

8. PLGA（ポリ（乳酸／グリコール酸）共重合体）を含み、結核  
5 に対するものであることを特徴とする請求項1、2、3又は6記載の治  
療薬。

9. さらに、リファンピシンを含むことを特徴とする請求項8記載の  
治療薬。

10

10. 分子量1,500から150,000のPLGAを含むことを特徴とする請  
求項1乃至9いずれかに記載の治療薬。

11. 分子量1,500から75,000のPLGAを含むことを特徴とする請  
15 求項1乃至9いずれかに記載の治療薬。

12. さらにPVA（ポリビニルアルコール）、PEG（ポリエチレ  
ングリコール）、PEO（ポリエチレンオキシド）、糖、タンパク質、  
ペプチド、リン脂質又はコレステロールの少なくとも1つを含むことを  
20 特徴とする請求項1乃至11いずれかに記載の治療薬。

13. さらに、PVA、PEG、PEO、糖、タンパク質、ペプチド、  
リン脂質又はコレステロールの少なくとも1つを含み、主たる粒子直径  
が1～6ミクロンである微粒子製剤であることを特徴とする請求項8又  
25 は9記載の治療薬。

14. (追加) 貪食されることによりマクロファージの貪食活性を亢進するこ  
とを特徴とする請求項1乃至3いずれかに記載の治療薬。

15 (b) 分子量5,000から20,000のPLGAを含み、結核に対するものであることを特徴とする請求項1記載の治療薬。

5 16 (b) 膜乳化法により製造されたものであることを特徴とする請求項15記載の治療薬。

17 (b) パントエア・アグロメランス (Pantoea agglomerans) のリポ多糖を含み、エイズに対するものであることを特徴とする請求項2記載の治療薬。

10

18 (b) パントエア・アグロメランス (Pantoea agglomerans) のリポ多糖を含み、肺がん細胞に対して細胞障害作用を有することを特徴とする請求項3記載の治療薬。